

ABSTRACT OF Italian Patent No. 01313701

APPLICATION NO. MI99A002622

The Italian Patent No. 01313701 with the title "Use of polyclonal antibodies for decontamination of liquid foodstuff from undesirable chemicals and micro-organic metabolites" discloses the use of insolubilised, specific polyclonal antibodies able to decontaminate liquid foodstuff, such as milk, water, wine, and juices, from chemical contaminants and micro-organic metabolic residues present in the liquid foodstuff.

According to the above said Italian patent specification, the contaminant present in the liquid foodstuff is captured by complexation with a polyclonal antibody specific for that contaminant, insolubilised by adhesion to a macromolecular solid phase, such as for example glass or plastic microspheres or magnetised metal microspheres, optionally coated with chemically derivatizable polymers.

Thanks to the fact that the antibody is insolubilised as said above, the complexes formed by this antibody with the contaminant can be separated from the liquid foodstuff by filtration.



**MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE**  
**DIREZIONE GENERALE PER LO SVILUPPO PRODUTTIVO E LA COMPETITIVITA'**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**

**BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

N. 01313701

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

num. domanda	anno	C.C.I.A.A.	data pres. domanda	classifica
002622	1999	MILANO	17/12/1999	A23L003

**TITOLARE** DOX-AL ITALIA S.P.A. A CORREZZANA (MILANO)

**RAPPR. TE** PALLINI DIEGO

**INDIRIZZO** NOTARBARTOLO & GERVASI S. P. A.  
C.SO DI PORTA VITTORIA, 9  
20122 MILANO

**TITOLO** USO DI ANTICORPI POLICLONALI PER DECONTAMINARE  
ALIMENTI LIQUIDI DA SOSTANZE CHIMICHE  
INDESIDERATE E METABOLITI MICROORGANICI.

**INVENTORE** VOLTATO IVO  
BIZZINI BERNARD EMILE  
VENERONI FLAVIO  
VOLTATO LORENZO



Roma, 9 SETTEMBRE 2002

**IL DIRIGENTE**  
F.to ANGELO CAPONE

PER COPIA CONFORME DELL'ORIGINALE

Consegnato il

08 OTT 2002



Il Segretario Generale  
(Pier Andrea Chevallard)

**Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :**

"Uso di anticorpi policlonali per decontaminare alimenti liquidi da sostanze chimiche indesiderate e metaboliti microorganici"

a nome di: DOX-AL ITALIA S.p.A.

con sede in: Correzzana (MI)

Inventori designati : Ivo Volpato, Bernard Emile Bizzini, Flavio Veneroni,  
Lorenzo Volpato

Depositata il \_\_\_\_\_ con il n° \_\_\_\_\_

\* \* \* \* \*

## CAMPO DELL'INVENZIONE

Anticorpi policlonali insolubilizzati formano complessi con sostanze chimiche o residui metabolici indesiderati al fine di eliminare tali contaminanti da alimenti liquidi.

## STATO DELL'ARTE

Gli alimenti liquidi, ad esempio latte, acqua, vino, succhi, possono venire contaminati da residui di diversa natura, ad esempio:

- a) sostanze disperse nel terreno o sulle piante a scopo disinfestante, antiparassitario o di altra natura;
- b) sostanze ingerite dagli animali produttori (latte) con l'alimentazione (farmaci, micotossine);
- c) metaboliti derivanti dalla microflora micotica ambientale (micotossine).

Questi contaminanti, se presenti, ammontano in genere a piccole quantità, per lo più nell'ordine variabile da nanogrammi a microgrammi, salvo rari casi di contaminazione accidentale. In ogni caso possono costituire

un potenziale rischio per il consumatore, rischio direttamente commisurato alle caratteristiche di quest'ultimo, essendo, ad esempio, maggiore nei lattanti e nei bambini.

L'eliminazione di agenti contaminanti dai liquidi alimentari rappresenta pertanto un problema di notevole importanza sia per la qualità del prodotto che per la tutela del consumatore.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

E' stato ora sorprendentemente trovato che anticorpi policlonali insolubilizzati specifici per l'agente contaminante sono in grado di decontaminare l'alimento liquido.

Pertanto la presente invenzione si riferisce all'uso di anticorpi policlonali insolubilizzati nella decontaminazione di alimenti liquidi da sostanze chimiche e residui metabolici microorganici, ed al processo di decontaminazione che li utilizza.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione è l'uso di anticorpi policlonali specifici per sostanze chimiche o residui metabolici microorganici, come decontaminanti di alimenti liquidi, essendo detti anticorpi insolubilizzati o legati ad una matrice inerte eliminabile durante il processo produttivo/preparativo dell'alimento.

Tra i residui metabolici microorganici contaminanti si citano aflatossine e ocratossine.

Un altro oggetto dell'invenzione è il procedimento di decontaminazione di alimenti liquidi da sostanza chimiche o residui metabolici

microorganici, che impiega anticorpi policlonali specifici insolubilizzati.

Il contaminante, sia esso una sostanza chimica o un residuo metabolico microorganico, eventualmente presente nell'alimento liquido, viene catturato per complessazione con l'anticorpo policlonale per esso specifico, ed essendo detto anticorpo reso insolubile per adesione su un supporto solido, come verrà spiegato più avanti, tale complessazione porta alla separazione dell'agente contaminante ed al suo allontanamento dall'alimento liquido per filtrazione.

La cattura del contaminante da parte dell'anticorpo adeso rispetta le regole dell'equimolarità, nel senso che ogni mole di anticorpo ha due siti di legame con l'antigene. Ciò implica la possibilità di definire esattamente la concentrazione di decontaminante in funzione dell'entità della contaminazione.

Gli anticorpi policlonali utili ai fini della presente invenzione vengono insolubilizzati per adesione ad una fase solida macromolecolare quale, ad esempio, palline di vetro o plastica facoltativamente ricoperte, o palline metalliche magnetizzate ricoperte, essendo detta fase solida facilmente filtrabile o comunque allontanabile dall'alimento liquido.

Detta fase solida macromolecolare, dopo l'impiego, può essere liberata dall'agente contaminante tramite lavaggio, ad esempio con HCl 0,1N ed acqua, e riutilizzata per numerosi cicli produttivi (da 10 a 50). La possibilità di riciclare la fase solida costituisce uno dei vantaggi economici della presente invenzione.

Il mantenimento del potere captante e quindi l'efficacia d'impiego, può

essere facilmente controllato in laboratorio mediante metodologie immunoenzimatiche ELISA di tipo competitivo.

Come già detto sopra la fase solida macromolecolare sulla quale aderire gli anticorpi policlonali dell'invenzione può essere rappresentata da palline di vetro o di plastica di diametro variabile da pochi micron (50-100  $\mu$ ) a 5-8 mm, facilmente reperibili sul mercato. Queste palline possono venire usate come tali oppure a seguito di ricopertura con sostanze contenenti gruppi  $-NH_2$  o  $-COOH$ . Le matrici possono essere biopolimeri o proteine. Tra i biopolimeri adatti ai fini della presente invenzione si citano alginati, chitosani, destrani, cellulose, ecc.; essi vengono prima derivatizzati, cioè aminati o carbossilati, previa ossidazione periodica, con procedimenti ben noti dallo stato dell'arte. Le proteine utili ai fini della presente invenzione possono essere, ad esempio, caseina, ovalbumina, proteina A, o anche gli stessi anticorpi usati per la cattura del contaminante.

Va rilevato che qualora si ricoprano le palline con caseina, essa non può essere usata per la saturazione successiva all'adesione dell'anticorpo.

Il processo di ricopertura può avvenire secondo le seguenti metodologie:

a) adesione fisica per immersione delle palline in una soluzione del polimero ricoprente, contatto sotto agitazione, lavaggio e successiva essiccazione delle palline trattate;

b) reticolazione della matrice in presenza della palline, condotta tramite metodi noti nell'arte, ad esempio per trattamento con reagenti bifunzionali quali l'epicloridrina; in fase di reticolazione le palline presenti nel mezzo rimangono incorporate nel reticolo polimerico.

Le palline facoltativamente ricoperte ed attivate con l'opportuno anticorpo policlonale, una volta immerse nell'alimento catturano il contaminante tramite l'anticorpo policlonale sopra detto, e vengono trattenute e recuperate per filtrazione.

Un altro tipo di palline utili ai fini della presente invenzione sono quelle metalliche magnetiche, aventi un diametro analogo alle palline già sopra illustrate e parimenti reperibili sul mercato. Queste palline devono essere necessariamente ricoperte, ed a tal fine si utilizzano le stesse matrici e le stesse metodologie sopra descritte.

Preferibilmente, la ricopertura delle palline viene effettuata con il metodo sopra descritto al punto a), utilizzando da 2 a 10  $\mu\text{g}$  di proteina, essendo il questo termine compresi anche gli anticorpi policlonali specifici secondo l'invenzione, preferibilmente 4  $\mu\text{g}$ , ed operando a 37°C per 3 ore, e quindi effettuando uno o più lavaggi, essiccazione e infine l'aggiunta dell'anticorpo policlonale desiderato, nel caso esso non sia la proteina di ricopertura.

Il vantaggio derivante dall'uso di palline magnetiche risiede nel loro rapido recupero tramite magnetizzazione della parete del recipiente dove viene condotta la decontaminazione. Questo è un motivo per cui esse possono venire riutilizzate per numerosi cicli produttivi, dopo lavaggio e distacco del contaminante sequestrato tramite coniugazione, e pertanto la loro incidenza sui costi di produzione è bassissima.

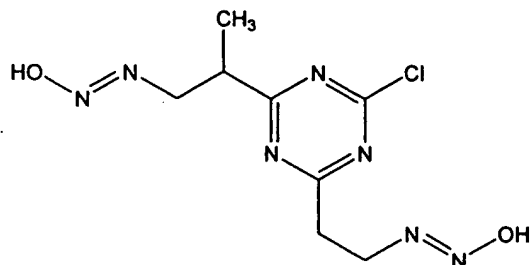
L'invenzione verrà ora illustrata più in dettaglio dai seguenti esempi.

#### ESEMPIO 1

Preparazione del coniugato atrazina-BSA

## Metodo A

## 1. Sintesi del diazoderivato



A 10 mg di atrazina ( $4,6 \times 10^{-6}$  moli) si sono aggiunti 10  $\mu$ l di HCl N ( $5 \times 10^{-6}$  moli). Il prodotto è stato bene imbevuto con una spatola e quindi, dopo avere posto in acqua bollente la provetta contenete la miscela, vi si sono aggiunti 900  $\mu$ l di acqua distillata. La risultante soluzione di atrazina-HCl è stata addizionata con HCl N (0,5 ml) poi raffreddata in bagno di ghiaccio. Dopo aggiunta di 1 mg di NaBr, si sono aggiunti, sotto agitazione e goccia a goccia, 260  $\mu$ l di una soluzione fredda di  $\text{NaNO}_2$  a 1 mg/ml (260  $\mu$ g,  $4,4 \times 10^{-6}$  moli). L'agitazione è stata proseguita per 1 ora sempre in ghiaccio a dare in diazoderivato in oggetto.

## 2. Coniugazione del diazoderivato con BSA

Ad una soluzione di BSA (siero albumina bovina, 8,4 mg) in 1 ml di tampone borato 0,1M, pH 9,0, raffreddata in ghiaccio, si è aggiunta la soluzione del diazoderivato di cui al punto 1. ( $4,6 \times 10^{-6}$  moli), goccia a goccia, sotto agitazione in un periodo di 15 minuti, mantenendo il pH costante per aggiunta, se necessario, di NaOH N. la miscela è stata fatta reagire per 2 ore in ghiaccio, quindi dializzata contro più cambiamenti di PBS.



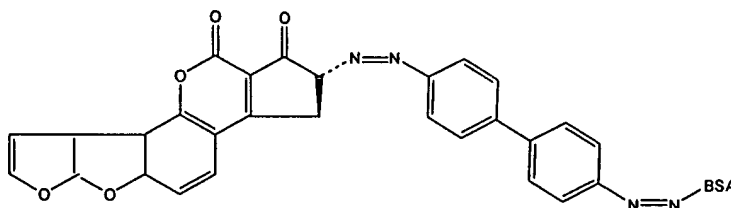
## Metodo B.

10 mg di atrazina ( $4,6 \times 10^{-6}$  moli) sono stati sciolti in 10 ml di una soluzione di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,07M, pH 8,2, e questa soluzione è stata addizionata con 20 mg (corrispondenti ad un contenuto in lisina pari a  $9 \times 10^{-7}$  moli) di BSA in polvere fino a dissoluzione, quindi con 40  $\mu\text{l}$  di glutaraldeide al 25%. La miscela è stata lasciata a reagire a temperatura ambiente per 3 ore, poi si aggiungono 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione di lisina 2M contro PBS, e si lascia ulteriormente reagire per 1 ora, quindi si dializza.

## ESEMPIO 2

Preparazione del coniugato aflatossina-BSA

## 1. Preparazione del bis-diazoderivato della benzidina



26 mg di benzidina  $\cdot 2\text{HCl}$  sono stato sciolti in 4,5 ml di HCl 0,2N, poi addizionati con 18 mg di  $\text{NaNO}_2$  sciolti in 0,5 ml di acqua distillata. La reazione è stata condotta in bagno di ghiaccio sotto agitazione per 1 ora, ed ha subito sviluppato una colorazione arancione.

## 2. Preparazione del coniugato aflatossina-BSA

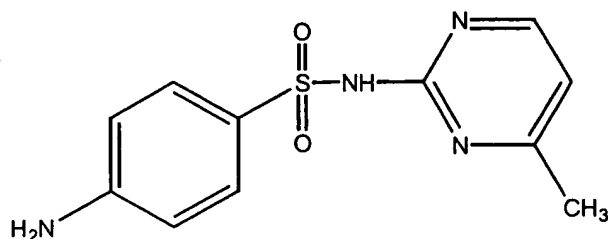
Una soluzione (50  $\mu\text{l}$ ) di BSA (10 mg/ml) in tampone borato 0,16M-NaCl 1,3M, pH 9 è stata aggiunta a 50  $\mu\text{g}$  di aflatossina liofilizzata. Alla miscela è stata aggiunta una miscela di 17  $\mu\text{l}$  della soluzione di bis-diazo-benzidina di cui al punto 1. e 33  $\mu\text{l}$  di tampone borato. Si è subito

svilupata una colorazione bruna e la reazione è stata fatta proseguire per 2 ore a 4°C sotto saltuaria agitazione, dopodiché la miscela è stata dializzata contro PBS.

### ESEMPIO 3

#### Preparazione del coniugato sulfametazina-OVA e sulfametazina-HSA

##### 1. Preparazione del diazo-derivato della sulfometazina



25 mg di sulfometazina ( $0,9 \times 10^{-4}$  mole) sciolti in 2 ml di HCl concentrato e 2 ml di acqua, sotto ghiaccio, sono stati addizionati con 2,5 mg di NaBr. Sempre in ghiaccio si sono sciolti 5,5 mg di NaNO<sub>2</sub> in 2 ml di acqua, sotto agitazione in 10 minuti, goccia a goccia. Quest'ultima soluzione è stata aggiunta a quella di sulfometazina, la miscela risultante è stata tenuta sotto agitazione per 1 ora in ghiaccio. Il volume è stato poi portato a 12 ml con acqua.

##### 2. Preparazione del coniugato sulfometazina-OVA

La soluzione del diazo-derivato di cui al punto 1. (3 ml,  $2,25 \times 10^{-5}$  moli) è stata gocciolata in una soluzione di OVA (ovalbumina; 4 ml,  $1 \times 10^{-6}$  moli), mantenendo il pH a 9-10 per aggiunta di NaOH 2N. L'aggiunta viene fatta lentamente in circa 15 minuti. La reazione è stata proseguita per altre 40 ore, a 4°C e sotto agitazione. La soluzione del coniugato è stata dializzata contro acqua. Esso ha un rapporto sulfometazina/ OVA di 22.

### 3. Preparazione del coniugato sulfometazina-HSA

Procedendo come descritto al punto 2. ed utilizzando 2 ml ( $3 \times 10^{-7}$  moli) di HSA (siero-albumina umana) e 4,5 ml del diazo-derivato di cui al punto 1. ( $3,37 \times 10^{-5}$  moli) si è ottenuto un coniugato con un rapporto sulfometazina/HSA di 112.

### ESEMPIO 4

#### Preparazione del coniugato ossitettraciclica-OVA ed ossitettraciclica-HSA

##### 1. Diazotazione dell'acido p-amino-benzoico

Una soluzione di acido p-aminobenzoico (PABA, 13,714 mg/ml) 0,1M in HCl M contenente 2 mg/ml di NaBr ed una soluzione di  $\text{NaNO}_2$  0,5M (34,5 mg/ml) in acqua distillata sono state poste separatamente in bagno di ghiaccio e raffreddate per 15 minuti. Alla soluzione di PABA (10 ml) si sono aggiunti per gocciolamento 2 ml della seconda soluzione, e la miscela è stata fatta reagire per 1 ora sempre in bagno di ghiaccio, ed infine si è ottenuta una soluzione del prodotto in oggetto 0.083M.

##### 2. Coniugazione ossitettraciclina-diazo-PABA

Ad una soluzione di ossitettraciclina 0,05M in NaOH 0,6M (10 ml, 24,845 mg/ml), raffreddata in un bagno di ghiaccio, si sono aggiunti, goccia a goccio sotto agitazione, 6 ml del prodotto del punto 1., regolando il pH a 9 per aggiunta di HCl 1M. la reazione è stata fatta proseguire per 4 ore sempre in bagno di ghiaccio su un volume finale di 16,65 ml, ed ha fornito 18,335 mg/ml del prodotto in oggetto.

##### 3. Preparazione del coniugato ossitettraciclina-HSA

Una soluzione (4 ml) di HSA (40 mg,  $6,12 \times 10^{-7}$  moli) in tampone acetato 0,1M, pH 5,5 è stata addizionata con 2,68 ml di una soluzione del prodotto del punto 2., mantenendo il pH a 6 per eventuale aggiunta di acido acetico o NaOH diluiti. Alla miscela di reazione si sono aggiunti 100 mg di EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide, Sigma E6383) e la reazione è stata fatta proseguire per 16 ore a temperatura ambiente controllando ed aggiustando il pH ogni 5 minuti durante la prima mezz'ora di reazione. La soluzione è stata quindi dializzata su tubo con taglio 12.000 contro PBS 0,1M, pH 7,4, effettuando più cambi nella giornata. La dialisi è stata considerata ultimata quando il tampone di dialisi si è mostrato incolore. Si aggiusta il volume fino ad ottenere 10 ml di una soluzione in PBS 0,1M, pH 7,4, contenente 4 mg/ml del prodotto in oggetto

#### 4. Preparazione del coniugato ossitettraciclina-OVA

Operando come al punto precedente ed utilizzando una soluzione di OVA (10 mg/ml,  $2,5 \times 10^{-7}$  moli) in tampone acetato 0,1M, pH 5,5, in ragione di 1 ml per 0,42 ml di soluzione del prodotto del punto 2., si sono ottenuti, con aggiustamento del volume, 10 ml di una soluzione in PBS 0,1M, pH 7,4, contenente 4 mg/ml del prodotto in oggetto

#### ESEMPIO 5

#### Immunizzazione degli animali per la produzione di anticorpi policlonali specifici

Lo schema seguente è stato utilizzato per tutte le tipologie di anticorpi utili ai fini della presente invenzione.

Conigli da 1,5-2 kg di peso sono stati sensibilizzati tramite intradermica da 1 mg di immunogeno come preparato nei precedenti esempi, risospeso in un 1 ml di fisiologica addizionata con 1 ml di adiuvante completo di Freund (Sigma). Si sono effettuate iniezioni in venti siti della zona dorsale iniettando 0,1 ml/sito. Dopo 21-28 giorni, si è provveduto alla somministrazione del richiamo iniettando a ciascun animale, intramuscolarmente, 0,25 mg di immunogeno risospeso in 0,5 ml di fisiologica addizionata con 0,5 ml di adiuvante incompleto di Freund (Sigma). Dopo un uguale numero di giorni si sono effettuati ulteriori richiami, sempre operando analogamente, sino a risposta anticorpale positiva. Dopodiché si è proceduto al prelievo degli antisieri (anticorpi) per salasso intracardiaco a cielo coperto.

#### ESEMPIO 6

##### Purificazione dei sieri

Ogni siero è stato addizionato con un uguale volume di una soluzione satura di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La miscela è stata sottoposta ad agitazione, quindi lasciata a riposo per una notte a 4°C. si è quindi centrifugato a 1000 xg per 20 minuti, ed il supernatante è stato eliminato. La soluzione è stata lavata due volte con una soluzione satura al 50% di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e ricentrifugata come sopra. Il precipitato è stato posto in un tubo da dialisi (taglio 12.000) usando il minore volume di fisiologica possibile. La dialisi è stata effettuata contro fisiologica per 48 ore effettuando più cambi durante la giornata. Il dializzato è stato ripreso, e se ne è misurato il

volume ed il titolo proteica per lettura a 280 nm ( $E=14$  per una soluzione di IgG al 1%).

#### ESEMPIO 7

##### Adesione di IgG anti-ossitetraciclina su palline di plastica

Palline di plastica da 5 mm sono state immerse in una soluzione di igG anti-ossitetraciclina (500  $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ ) in PBS 0,1M, pH 7,4, in ragione di 1 ml di soluzione per pallina. Le palline sono state lasciate nella soluzione per una notte a 4°C ambiente su agitatore a rulli. La soluzione è stata poi eliminata e si sono effettuati due lavaggi con PBS 0,1M, pH 7,4 (2 ml per pallina). Si è quindi proceduto alla saturazione con una soluzione di caseina al 2% in PBS 0,1M, pH 7,4 (1 ml per pallina), operando per 4 ore a temperatura ambiente su agitatore a rulli. La soluzione di caseina è stata quindi allontanata e si sono effettuati 3 lavaggi con PBS 0,1M, pH 7,4 e Tween 20 0,1% (2 ml per pallina). Le palline sono state conservate in PBS 0,1M, pH 7,4.

Dalla determinazione per via chimica del contenuto proteico della soluzione di IgG anti-ossitetraciclina prima e dopo il trattamento delle palline si è rilevato che per la soluzione da 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  si è ottenuto un legame di 32,3  $\mu\text{g}$  di IgG anti-ossitetraciclina per pallina.

Il calcolo teorico del potere decontaminante per una pallina avente adesi 32,3  $\mu\text{g}$  di IgG anti-ossitetraciclina ( $2,15 \times 10^{-10}$  moli), ammettendo che entrambi i siti reattivi della IgG siano disponibili al legame, è di 0,198  $\mu\text{g}$  di ossitetraciclina ( $4,3 \times 10^{-10}$  moli).

#### ESEMPIO 8

Adesione di IgG anti-aflatossina su palline di plastica pre-sensibilizzate con proteina A (Sigma P6031)

1. Sensibilizzazione delle palline con proteina A

In una soluzione di proteina A in tampone carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,5 (2 µg/ml di proteina) sono state immerse palline di plastica del diametro di 5 mm, in ragione di una pallina/ml di soluzione. Le palline sono state lasciate nella soluzione per una notte, alla temperatura di 4°C sotto agitazione a rulli. La soluzione è stata poi eliminata e le palline lavate una volta con un tampone sali/fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,4 contenente Tween 20 allo 0,1%.

2. Saturazione delle palline

In una soluzione di BSA (siero-albumina bovina, Sigma) al 2% p/v in tampone PBS 0,05M, pH 7,4, si sono immerse le palline di plastica del punto 1., in ragione di 1 pallina/ml di soluzione. Le palline sono state lasciate sotto agitazione, su agitatore a rulli, per 2 ore a 37°C. Dopo eliminazione della soluzione di BSA, le stesse sono state sottoposte a 2 lavaggi con tampone PBS 0,01M, pH 7,4 contenente Tween 20 allo 0,1%.

3. Adesione delle IgG

In una soluzione di IgG anti-aflatossina in tampone PBS 0,05M, pH 8 contenente BSA allo 0,1% e Tween 20 allo 0,1%, si sono immerse le palline del punto 2. La concentrazione delle IgG nella soluzione è di 20 µg/ml. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per una notte, su agitatore a rulli, a 4°C. La soluzione di IgG non adese è stata quindi

eliminata.

#### 4. Saturazione della proteina A

Questa fase ha lo scopo di bloccare la proteina A non reagite con le IgG specifiche e di impedire che durante il processo di decontaminazione la reazione della proteina A rimasta libera, con eventuali proteine presenti nel mezzo da decontaminare, possa generare un ingombro sterico in grado di ridurre il potenziale di decontaminazione delle IgG. Pertanto un tale passaggio è utile, ma non strettamente necessario ai fini del risultato.

In una soluzione di siero suino (specie animale diversa da quella usata per la produzione di IgG, diluito 1:20 (5% v/v) in tampone PBS 0,05M, pH 8, si sono immerse le palline del punto 3., in ragione di 1 pallina/ml di soluzione serica. La miscela è stata lasciata sotto agitazione, su agitatore a rulli, per 2 ore a 37°C. Dopo eliminazione della soluzione, le palline sono state lavate per 3 volte con PBS 0,01M, pH 7,4 contenete Tween 20 allo 0,1%. Le palline sono state quindi asciugate e conservate a 4°C.

#### ESEMPIO 9

##### Decontaminazione da ossitetraciclina

In una soluzione (5 ml) contenente  $3,3 \times 10^{-8}$  moli di ossitetraciclina in totale, si sono immerse 5 palline aventi adese, globalmente, 1,075 moli di IgG anti-ossitetraciclina (pari a  $2,15 \times 10^{-9}$  siti di fissazione), preparate secondo il metodo descritto nell'esempio 7. Le palline sono state tenute a contatto con la soluzione, sotto agitazione, per 30 minuti a temperatura



ambiente. Al termine, dopo separazione delle palline per filtrazione, si è determinata la concentrazione residua di ossitetraciclina presente nella soluzione, impiegando in parallelo metodi analitici ELISA ed HPLC. Si è ottenuto un decremento della concentrazione di ossitetraciclina nella soluzione del 7,51%, equivalente ad un potere di fissaggio da parte delle IgG adese alle palline pari al 100% della loro capacità.

## Rivendicazioni

1. Uso di anticorpi policlonali specifici per sostanze chimiche o residui metabolici di natura microorganica, come decontaminanti di alimenti liquidi.
2. Uso di anticorpi monoclonali secondo la rivendicazione 1 in cui i residui metabolici microorganici sono aflatossine e ocratossine.
3. Uso di anticorpi policlonali secondo la rivendicazione 1 legati ad una fase solida macromolecolare inerte.
4. Uso di anticorpi policlonali secondo la rivendicazione 3 in cui la fase solida macromolecolare è scelta dal gruppo comprendente palline di vetro o di plastica aventi un diametro compreso tra 50 $\mu$  e 10 mm.
5. Uso di anticorpi policlonali secondo la rivendicazione 3 in cui la fase solida macromolecolare è scelta dal gruppo comprendente palline di vetro, di plastica, e metalliche magnetizzate aventi un diametro compreso tra 50 $\mu$  e 10 mm e ricoperte con adatte sostanze recanti gruppi funzionali.
6. Uso secondo la rivendicazione 5 in cui i gruppi funzionali della sostanza di ricopertura sono gruppi NH<sub>2</sub> e/o COOH.
7. Uso secondo la rivendicazione 6 in cui le sostanze di ricopertura sono scelte dal gruppo comprendente biopolimeri e proteine.
8. Uso secondo la rivendicazione 7 in cui i biopolimeri sono scelti dal gruppo comprendente alginati, chitosani, destrani, e cellulose, opportunamente derivatizzati.
9. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui la derivatizzazione avviene per

ossidazione periodica.

10. Uso secondo la rivendicazione 7 in cui le proteine eterologhe sono scelte dal gruppo comprendente caseina, ovalbumina, proteina A, e gli stessi anticorpi policlonali della rivendicazione 1.

11. Uso secondo la rivendicazione 5 in cui le palline vengono ricoperte tramite adesione fisica ottenuta per immersione delle palline in una soluzione della sostanza ricoprente, contatto sotto agitazione e successiva essiccazione delle palline trattate.

12. Uso secondo la rivendicazione 11 in cui le palline vengono trattate con da 2 a 10  $\mu\text{g}$  di proteina per pallina.

13. Uso secondo la rivendicazione 12 in cui le palline vengono trattate con 4  $\mu\text{g}$  di proteina per pallina.

14. Uso secondo la rivendicazione 5 in cui la sostanza ricoprente viene reticolata in presenza della palline che rimangono incorporate nel reticolo.

15. Uso secondo la rivendicazione 14 in cui la reticolazione è realizzata per mezzo di reagenti bifunzionali.

16. Uso secondo la rivendicazione 15 in cui il reagente bifunzionale è epicloridrina.

17. Procedimento per la decontaminazione di alimenti liquidi da sostanze chimiche e metaboliti caratterizzato dal fatto che anticorpi policlonali specifici per dette sostanze ed insolubilizzati vengono aggiunti agli alimenti da decontaminarsi e formano con gli agenti contaminanti complessi che vengono allontanati per filtrazione.

18.Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detti anticorpi sono legati ad una fase solida macromolecolare inerte.

19.Procedimento secondo la rivendicazione 18 in cui la fase solida macromolecolare è scelta dal gruppo comprendente palline di vetro o di plastica aventi un diametro compreso tra  $50\mu$  e 10 mm.

20.Procedimento secondo la rivendicazione 19 in cui la fase solida macromolecolare è scelta dal gruppo comprendente palline di vetro, di plastica, e metalliche magnetizzate aventi un diametro compreso tra  $50\mu$  e 10 mm e ricoperte con adatte sostanze recanti gruppi funzionali.

21.Procedimento secondo la rivendicazione 20 in cui i gruppi funzionali della sostanza di ricopertura sono gruppi  $\text{NH}_2$  e/o  $\text{COOH}$ .

22.Procedimento secondo la rivendicazione 21 in cui le sostanze di ricopertura sono scelte dal gruppo comprendente biopolimeri e proteine.

23.Procedimento secondo la rivendicazione 22 in cui i biopolimeri sono scelti dal gruppo comprendente alginati, chitosani, destrani e cellulose, opportunamente derivatizzati.

24.Procedimento secondo la rivendicazione 23 in cui la derivatizzazione avviene per ossidazione periodica.

25.Procedimento secondo la rivendicazione 22 in cui le proteine eterologhe sono scelte dal gruppo comprendente caseina, ovalbumina, proteina A, e gli stessi anticorpi policlonali della rivendicazione 1.

26.Procedimento secondo la rivendicazione 20 in cui le palline vengono ricoperte tramite adesione fisica ottenuta per immersione delle palline in una soluzione della sostanza ricoprente, contatto sotto agitazione e suc-

cessiva essiccazione delle palline trattate.

27.Procedimento secondo la rivendicazione 26 in cui le palline vengono trattate con da 2 a 10  $\mu\text{g}$  di proteina per pallina.

28.Procedimento secondo la rivendicazione 27 in cui le palline vengono trattate con 4  $\mu\text{g}$  di proteina per pallina.

29.Procedimento secondo la rivendicazione 20 in cui la sostanza ricoprente viene reticolata in presenza della palline che rimangono incorporate nel reticolo.

30.Procedimento secondo la rivendicazione 29 in cui la reticolazione è realizzata per mezzo di reagenti bifunzionali.

31.Procedimento secondo la rivendicazione 30 in cui il reagente bifunzionale è epicloridrina.

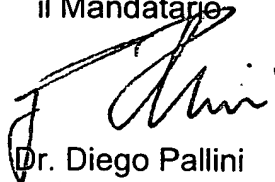
(ROS/lm)



Milano, 17 Dicembre, 1999

p. DOX-AL ITALIA S.p.A.

il Mandatario



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.